

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D 26 JUN 2000

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 199 21 419.0
Anmeldetag: 08. Mai 1999
Anmelder/Inhaber: Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg,
Heidelberg, Neckar/DE
Bezeichnung: Verfahren zum spezifischen Nachweis und
zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren/
Retroviren in einem Untersuchungsgut
IPC: C 07 H, C 12 N, C 12 Q

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 15. Juni 2000
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
 Im Auftrag

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



"Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem Untersuchungsgut"

5

B e s c h r e i b u n g

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem beliebigen Untersuchungsgut und Diagnosekits zur Durchführung dieses Verfahrens. Sie betrifft außerdem retrovirusspezifische Sonden für die Reverse Dot Blot Hybridisierung und retrovirusspezifische, Vorwärts- und Umkehrprimer umfassende Oligonukleotid-Primermischungen (MOP) für die Erzeugung von Amplifikaten retrovirusspezifischer Nukleinsäuren aus dem Untersuchungsgut.

- 15 Exogene und endogene Retroviren (HERV) sind ätiologisches Agenz für eine Vielzahl von tumorigen Erkrankungen bei Mensch und Tier. In zahlreichen Tiermodellen, aber auch beim Menschen (HTLV-I und II) sind sie an der Entstehung von Tumoren und Leukämien beteiligt. Andere hingegen verursachen Immundefizienzerkrankungen (HIV). Gegenwärtige Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß Retroviren auch als Auslöser von Autoimmunerkrankungen (Kalden und Herrmann, 1993) und neuronalen degenerativen Erkrankungen wie multipler Sklerose (Tuke et al. 1997) eine Rolle spielen können. Intensive Forschung auf dem Gebiet der endogenen und exogenen Retroviren führte bislang zur Entdeckung laufend neuer retroviraler Sequenzen im menschlichen Erbgut, deren Expression möglicherweise mit bestimmten Erkrankungen assoziiert sein könnte. So ist die Expression von Gag-Proteinen der HERV-K Familie mit fast allen Formen testikulärer und ovarieller Keimzelltumoren assoziiert (Sauter et al. 1995). In menschlichen Seren wurden Antikörper gegen HERV-K Env Protein nachgewiesen (Vogetseder et al. 1993). Das *env* Gen von HERV-K-IDDM, das aus Patienten mit Diabetes Typ-1 isoliert wurde, kodiert möglicherweise für ein endogenes Superantigen
- 20 25 30 (Conrad et al. 1997).

Zur Korrelation bestimmter Erkrankungen mit der Aktivität bestimmter endogener oder exogener Retroviren sind statistisch abgesicherte Studien mit großen Patientenkollektiven notwendig. Der hierfür erforderliche Zeit- und Kostenaufwand mit den im Stand der Technik bekannten Nachweisverfahren ist immens.

5

Der zunehmende Einsatz retroviraler Vektorsysteme in der humanen Gentherapie wirft Fragen hinsichtlich der Sicherheit vor unerwünschten Nebenwirkungen (Genomveränderungen in den Zielzellen, Übertragung unerwünschter Viren) auf. So werden in Verpackungszelllinien zu einem gewissen Prozentsatz auch unerwünschte Genabschnitte endogener oder fremder Retroviren in die therapeutisch zu applizierenden retroviralen Partikel mitverpackt (Co-packaging, Sherwin et al. 1987, Scolnick et al. 1979, Takeuchi et al. 1992). So konnten Transkripte bestimmter endogener Retroviren, wie sie in verwandter Form auch im Genom von Verpackungszelllinien vorhanden sind, in Retrovirus-ähnlichen Partikeln (Pseudotypen) der Brustkrebszelllinie T47D nachgewiesen werden (Seifarth et al. 1995, 1998). Die Verpackung solcher unerwünschten retroviralen Sequenzen kann zur Rekombination und zur Entstehung neuer Retroviren mit veränderten, möglicherweise pathogenen Eigenschaften, führen. Die Neuintegration solcher rekombinanter Retroviren im Genom der Zielzellen kann zu Insertionsmutagenese und dadurch zur Inaktivierung wichtiger Gene des Zellzyklus und möglicherweise zur Tumorgenese führen.

Aus diesem Grund ist es notwendig, mit einem empfindlichen Testsystem eine Qualitätskontrolle der gentherapeutisch einzusetzenden Genvektorpräparationen durchzuführen. Damit könnte vermieden werden, daß unerwünschte retrovirale Sequenzen transfundiert werden. Bei positivem Nachweis könnte eine Vektorpräparation vor der Gabe an den Patienten noch einer entsprechenden Reinigung (Purging) unterzogen werden. Die im Stand der Technik bislang bekannten Verfahren sind für einen solchen Einsatz nicht geeignet.

30 Eine gegenwärtig umstrittene Frage ist der Einsatz von Tierorganen für die Transplantation am Menschen (Xenotransplantation). So werden aus Ermangelung

- geeigneter Spender dem Menschen vermehrt Herzklappen von Schweinen transplantiert. Auch die Übertragung von Herz-, Leber- und Nieren-Transplantaten ist geplant. Jüngste Untersuchungen ergaben aber, daß es im Rahmen der Transplantation und der damit verbundenen medikamentösen Immunsuppression beim Empfänger zur Aktivierung 5 endogener oder bislang supprimierter exogener Retroviren im Spenderorgan kommen kann. Wie experimentell bereits nachgewiesen wurde, sind diese Retroviren tierischen Ursprungs pathogen für bestimmte menschliche Zelltypen (Xenotropismus) und könnten somit zu einer ernsthaften systemischen Erkrankung des Organempfängers führen. Im Falle der Bildung pathogener infektiöser Viruspartikel ist auch eine Übertragung auf 10 unbeteiligte Dritte (Epidemie) nicht auszuschließen. Nicht zuletzt könnten Rekombinationen von Retroviren tierischen Ursprungs mit endogenen humanen Retroviren zu neuen pathogenen Virusrekonkombinanten mit völlig neuen Wirtstropismen führen.
- Es besteht daher der Bedarf an schnellen, zuverlässigen und zugleich preisgünstigen 15 Detektionssystemen, mit dem Transplantat-Träger regelmäßig auf eine Infektion mit Retroviren tierischen Ursprungs getestet werden können.

- Für den Nachweis viraler Infektionen stehen im Stand der Technik bislang eine Reihe von 20 Methoden des direkten und indirekten Virus-Nachweises zur Verfügung. Zum direkten Nachweis von Viruspartikeln, Produkten der viralen Replikation (virale Antigene) oder einer gegen das Virus gerichtete Immunantwort (antivirale Antikörper), gehören Elektronenmikroskopie (EM), Färbung viraler Proteine mit fluoreszierenden Antikörpern, „enzyme-linked immunosorbent assay“ (ELISA) und Radioimmunassays (RIA). Zum direkten Nachweis des Virus und seiner Nukleinsäuren werden auch 25 zunehmend molekularbiologische Methoden, wie Nukleinsäurehybridisierungen mit Virus-spezifischen Gensonden (Dot-Blot, Southern-Blot, Northern-Blot) sowie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit Virus-spezifischen Primern durchgeführt.

- Mit den indirekten Methoden werden in der Regel nicht die Viren selbst, sondern ihre 30 Folgeerscheinungen, d. h. die durch eine Virusvermehrung (Replikation) induzierten Veränderungen (zytopathische Effekte) in Zellen nachgewiesen. Dies muß meist in einem

auf das nachzuweisende Virus zugeschnittenen *in vitro* Zellkultursystem durchgeführt werden. Dafür werden lebende Zellen, in denen das nachzuweisende Virus replizieren kann, benötigt. Je nach Virustyp sind Zellkulturen, Organkulturen, befruchtete Hühnereier oder sogar Labortiere für den Nachweis erforderlich. Das Erscheinungsbild des zytopathischen Effekts (Zell-Lyse, fokales oder diffuses Zellwachstum, Synzytienbildung, Abrundung) und das Wirtsspektrum des Virus wird als Indiz für die Identifizierung des Virusisolates herangezogen. Oft aber ist die genaue Identifizierung nur in Kombination mit serologischen oder molekularbiologischen Methoden (PCR) möglich.

10

Die relativ geringe Sensitivität einiger direkter Nachweismethoden (EM, Antikörperfärbung) macht es notwendig, daß das Untersuchungsmaterial für einen erfolgreichen Nachweis eine bestimmte Menge an Virus enthalten muß oder durch geeignete Methoden (Ultrazentrifugation) angereichert werden muß. Ist dies nicht praktizierbar, muß das Virus vorher in einem speziellen *in vitro* Zellkultursystem angezüchtet werden. Da viele Viren spezielle Wirtszelltropismen besitzen, ist für jedes zu testende Virus ein spezielles Testsystem notwendig. Dies resultiert in hohen Laborkosten, deren Auswertung zum Teil sehr zeitintensiv ist und sehr viel Erfahrung erfordert.

15

Serologische Methoden (ELISA, RIA) sind in der Regel hochsensitiv und haben sich zum gängigen Goldstandard in der Virusdiagnostik entwickelt. Der Nachteil aller serologischer Methoden ist aber, daß für jeden zu testenden Virus ein spezifischer Antikörper notwendig ist. In einem Testdurchlauf kann die zu untersuchende Probe somit nur auf ein putatives Virus getestet werden. Die Untersuchungen von ganzen 20 Expressionsmustern ist mit diesen Methoden nur unter großem zeitlichen und finanziellen Aufwand möglich.

Entwicklungen auf dem Gebiet der Molekularbiologie haben zur Entwicklung neuer Nachweismethoden (Hybridisierungen, PCR) geführt, die eine ähnliche Empfindlichkeit wie serologische Antigen-Nachweismethoden besitzen. Auch hier steht und fällt der 25 Nachweiserfolg mit der Verfügbarkeit Virus-spezifischer Gensonden (Hybridisierung) oder Oligonukleotide (PCR). Da der Einsatz mehrerer Sonden oder PCR-Primer

30

aufgrund unspezifischer Wechselwirkungen in einem Reaktionsansatz limitiert ist, müssen zum Nachweis komplexer Expressionmuster ebenfalls viele Experimente parallel durchgeführt werden.

- 5 Angesichts der vorstehend geschilderten Umstände war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein leistungsfähiges und zuverlässiges, zugleich schnelles Verfahren zum multiplen Nachweis endogener und exogener Retroviren menschlichen und tierischen Ursprungs bereitzustellen.
- 10 Diese Aufgabe wird mit einem Verfahren der eingangs genannten Art gelöst, das dadurch gekennzeichnet ist, daß es die folgenden Maßnahmen umfaßt:
Isolierung der Nukleinsäuren, nämlich DNS- und/oder RNS, aus dem Untersuchungsgut,
- Durchführung einer PCR mit der isolierten DNS oder einer RT-PCR mit der isolierten RNS unter Verwendung von einer oder beiden der nachfolgend dargestellten,
- 15 jeweils aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehenden Primermischungen MOP-ABD und MOP-C, deren Vorwärtsprimer und Umkehrprimer degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 bis NO. 4 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen sind, wobei
- 20 die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, nämlich: "Kopf"-ARAGTNYTDYCHCMRGGH, mit 3456 Degenerationen aufweisen,
- 25 die Umkehrprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, nämlich: "Kopf"-NWDDMKDTYATCMAYRWA, mit 27648 Degenerationen aufweisen,
- die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 3, nämlich: "Kopf"-TKKAMMSKVYTRCYHCARGGG, mit 3072 Degenerationen aufweisen, und
- 30 die Umkehrprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 4, nämlich: "Kopf"-MDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA, mit 8192 Degenerationen aufweisen,

wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer-(clamp)-Sequenz (für die Stabilisierung der Schnittstellensequenz) am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt,

- Aufreinigung der erhaltenen (RT-) PCR-Amplifikate und Einsatz derselben in
- 5 einem RDBH-Verfahren unter Verwendung immobilisierter RDBH-Sonden, die jeweils (je Sonde) synthetische Oligonukleotide umfassen, deren Nukleotidsequenz der retroviroalen Nukleotidsequenz des retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens der mit dem betreffenden Dot nachzuweisenden Virusart oder einem Abschnitt einer solchen
- retroviroalen Nukleotidsequenz entspricht und keine Überlappung mit den
- 10 Nukleotidsequenzen der in der PCR oder RT-PCR eingesetzten Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) aufweist.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis von retroviroalen Nukleinsäuren in einer Probe, wobei zuerst alle Nukleinsäuren (RNA und

- 15 DNA) unter Einsatz gängiger, dem Fachmann bekannten Methoden, aus dem Untersuchungsgut extrahiert werden. Hierbei wird zwischen DNA und RNA unterschieden. Für den Nachweis von bereits ins Wirtszellgenom integrierten Retroviren (Proviren) ist die Isolation von genomischer DNA ausreichend. Soll die Aktivierbarkeit bislang ruhender Retroviren, die Transkriptionsaktivität endogener Retroviren oder die
- 20 Identität retroviraler Partikel untersucht werden, muß polyadenyierte Boten-RNA (mRNA) isoliert werden, die frei von genomischer DNA ist. Im Falle der Verwendung von mRNA als Ausgangsmaterial muß diese mRNA *in vitro* mittels Reverser Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden und kann dann als Matrize für die sich anschließende PCR eingesetzt werden. Diese Kombination von
- 25 reverser Transkription und PCR wird gemeinhin als RT-PCR bezeichnet.

Die isolierten Nukleinsäuren werden anschließend einer Ein-Schritt PCR unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischungen (MOP-ABD, MOP-C) aus retroviruspezifischen, degenerierten, zu den hochkonservierten Regionen innerhalb des

Reverse Transkriptase Gens (RT-Gens) aller bekannten humanen Retroviren

- 30 korrespondierenden Oligonukleotiden (MOP, Shih et al. 1989, Donehower et al. 1990), unterworfen. Bei dieser PCR werden sämtliche retroviruspezifischen

'Reverse Transkriptase' - homologen Sequenzabschnitte, die im Untersuchungsgut enthalten sind, amplifiziert. Als Ergebnis erhält man ein Amplifikatgemisch kurzer retroviraler DNA-Fragmente, das in seiner Zusammensetzung die Häufigkeit aller nachzuweisenden retroviralen Nukleotidequenzen in dem Untersuchungsgut

- 5 wiederspiegelt. Die Amplifikate werden entweder bereits während der PCR-Reaktion oder im Anschluß daran markiert, vorzugsweise radioaktiv, wahlweise aber ebensogut auch nichtradioaktiv (z.B. mit Biotin oder Digoxigenin). Anschließend werden diese markierten Amplifikate in einem Hybridisierungsverfahren (RDBH-Verfahren) unter Verwendung von Filtermembranen oder Bio-Chips mit aufgebrachten, retrovirusspezifischen Oligonukleotiden als Sonden eingesetzt.

10 Die aus Klammer- und Schnittstellensequenz bestehende Kopf- bzw. Extensionssequenz der erfindungsgemäßen Primeroligonukleotide, hat zum einen den positiven Effekt, daß sie die Primer-Matrizen-Bindungskinetik günstig beeinflußt, so daß die in dem ersten PCR-Zyklus gebildeten PCR-Produkte in den folgenden Zyklen noch wesentlich

- 15 effizienter amplifiziert werden. Damit ist der Vorteil verbunden, daß retrovirale Matrizen selbst dann amplifiziert werden bzw. werden können, wenn der exakt dazu passende Primer nicht in der Primermischung vorhanden ist. Die Schnittstelle hat außerdem den Vorteil, daß sie im Bedarfsfall die Durchführung einer Klonierung erleichtert.

Grundsätzlich gilt, daß die Länge der Kopf- bzw. Extensionssequenz die halbe Länge der 20 kompletten Primernukleotidsequenz nicht überschreiten sollte.

Wesentlicher Bestandteil des erfindungsgemäßen Verfahrens sind die für die Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH) verwendeten RDBH-Sonden, bei denen es sich um bestimmte Mengen synthetisch erzeugter, genau definierter Nukleinsäuresequenzen aus

- 25 dem Reverse Transkriptase Gen derjenigen bereits charakterisierten Retroviren handelt, gegen die das Untersuchungsgut getestet werden soll. Diese retrovirusspezifischen RDBH-Sonden sind auf definierten Feldern (Dots) der RDBH-Träger aufgebracht, wobei es sich sowohl um althergebrachte Filtermembranen mit Abmessungen von mehreren Zentimetern handelt kann, als auch um sogenannte Bio-Chips mit Abmessungen von 30 wenigen Millimetern ("Micro-Array-Technologie"). Im Fall von Filtermembranen werden die Sonden vorzugsweise kovalent durch UV-Crosslinking (z.B. mit der kommerziell

erhältlichen UV-Strahlungsquelle 'Stratalinker™', Stratagene) an diesen Träger gebunden.

Bei den DNA-Chips werden Oligonukleotid-Sonden *in situ* synthetisiert und mit genau definierten Positionen auf einem festen Träger mit Methoden der Photolithographie

- 5 . (ähnlich einer Gravur) fixiert, (z.B. indem unter Verwendung von Lochmasken bestimmte Bereiche des Chips belichtet werden, um photosensitive chemische Gruppen zu aktivieren). Der Träger, vorzugsweise eine Glas- oder Nylonoberfläche von ca. 1 cm², bildet die Hybridisierungseinheit. Jede Hybridisierungseinheit kann eine sehr hohe Zahl an unterschiedlichen Oligonukleotid-Sonden (bis zu 400.000) enthalten. Dadurch wird die gleichzeitige Analyse von vielen tausend verschiedenen Sequenzen ermöglicht. Für jede Sonde werden alle Sequenz-Alternativen auf dem Chip dargestellt, eine einzige davon muß von dem zu testenden Untersuchungsgut erkannt werden. Die Hybridisierung von Sonde und Zielsequenz (im Untersuchungsgut) wird über die Messung der Amplifikatmarkerintensität nachgewiesen. Die Intensität ist proportional zum Ausmaß
- 10 der Hybridisierung zwischen Sonde und Zielsequenz. Jede Zielsequenz wird nach ihrer Hybridisierungsposition auf dem Chip identifiziert. Die Technik der DNA-Chips wurde von FODOR et al. (Science 251, 767-773, 1991) entwickelt und ist im Stand der Technik bekannt (vgl. V. Oeding et al., 1999, *HYGIENE UND MIKROBIOLOGIE* 1/99, S. 55-57 und G. Ramsay 1998, *NATURE BIOTECHNOLOGIE*, Vol. 16, 1998, S.40-
- 15
- 20 44.).

Die Hybridisierung sollte unter hochstringenten, auf die Länge der Sonden abgestimmten Bedingungen erfolgen, und die hybridisierten Träger (Filtermembranen oder Chips) sollten anschließend unter Bedingungen hoher Stringenz gewaschen werden. Die Identität der nachweisbaren Retroviren kann – im Fall einer radioaktiven Markierung der

- 25 PCR-Amplifikate - nach Exposition der Filtermembranen auf einem Röntgenfilm anhand der Signalmuster der Autoradiogramme identifiziert werden.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht den multiplen Nachweis und die Identifizierung aller bislang bekannten humanen und/oder tierspezifischen retroviralen

- 30 Nukleinsäuren/Retroviren in Zellkulturen, Zellkulturüberständen oder Körperproben oder sonstigem Untersuchungsgut biologischen Ursprungs. Voraussetzung ist lediglich,

daß bestimmte Genomabschnitte der nachzuweisenden Retroviren, nämlich die konservierten Sequenzbereiche der Reversen Transkriptase, hinsichtlich ihrer DNA-Nukleotidsequenz bekannt sind. Diese Voraussetzung ist erfüllt, da die entsprechenden Nukleotidsequenzen exogener und endogener humaner Retroviren als Genbankdaten 5 allgemein zugänglich sind.

Das erfindungsgemäße Verfahren eröffnet erstmals die Möglichkeit der Bereitstellung eines universellen Retrovirus-Detektionssystems, mit dessen Hilfe in einem einzigen Experiment das gesamte Spektrum (= Expressionsmuster) aller aktiven endogenen und 10 exogenen retroviralen Nukleotidsequenzen im Untersuchungsgut (Körperprobe) erfaßbar ist. Mit diesem Detektionssystem können insbesondere auch statistisch abgesicherte Studien mit beliebig großen Patientenkollektiven durchgeführt werden und daraus gegebenenfalls bestehende Korrelationen zwischen bestimmten Erkrankungen und der Aktivität bestimmter endogener oder exogener Retroviren festgestellt werden. Im Falle 15 einer nachgewiesenen Korrelation eines bestimmten retroviralen Expressionsmusters mit einer bestimmten Erkrankung kann dieses Testsystem auch zur Früherkennung bzw. zur Abschätzung des persönlichen genetischen Risikos für eine solche Erkrankung eingesetzt werden.

20 Ein weiterer ganz entscheidender Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß die erfindungsgemäßen PCR-Primer (MOP), d.h. die degenerierten Oligonukleotide der Primermischungen, die für die Amplifikation der zu identifizierenden retrovirusspezifischen RT-Genabschnitte im Untersuchungsgut verwendet werden, in ihrer Sequenz nicht mit den Sequenzen der als Dot Blot Sonden eingesetzten 25 synthetischen virusspezifischen Oligomere überlappen. Die PCR-Primersequenzen tragen nämlich ungefähr zur Hälfte der endgültigen Amplifikatlänge bei. Wären diese Sequenzabschnitte auch in den Dotblot-Sonden enthalten (vgl. Herrmann und Kalden, 1994), würde dies zu erheblichen Einschränkungen in der Aussagekraft des Tests führen, da die Amplifikate dann zu einem gewissen Maße mit allen Dotblot-Sonden auf der 30 Filtermembran hybridisieren würden. Es ist der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß dieser unerwünschte Effekt durch die Verwendung synthetischer,

präzise definierter, homogener Oligonukleotidpräparationen für Vorwärts- (forward) und Umkehrprimer (reversed primer) einerseits und für die RDBH-Sonden andererseits verhindert wird.

- 5 Die Nukleotidsequenzen aller bislang charakterisierten exogenen und endogenen Retroviren (HERV) sind in Genbanken publiziert. Von ihnen können entsprechende Nukleotidsequenzen für die Synthese virusspezifischer Oligomere als Dot Blot-Sonden abgeleitet werden. Prinzipiell können entsprechende Oligomere all dieser Sequenzen auf eine einzige Filtermembran aufgedottet werden. Demzufolge ist es möglich, ein
10 Untersuchungsgut in einem einzigen Experiment auf das gesamte Spektrum bislang bekannter Retroviren zu testen. Im Vergleich zum Stand der Technik, demgemäß für die Identifizierung eines jeden in einer Probe vermuteten Virus ein eigener Diagosetest, insbesondere serologischer Test unter Verwendung eines speziellen Antikörpers, durchgeführt werden muß, stellt das erfindungsgemäße Verfahren somit einen
15 bedeutenden Fortschritt dar.

Aufgrund der bekanntermaßen hohen Sensitivität der PCR und der Möglichkeit der wiederholten Reamplifikation von PCR-Produkten wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren zudem eine Nachweisgrenze erreicht, die von kaum einem anderen Testsystem
20 erreicht wird.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht der "Kopf"- oder Extensionsabschnitt der erfindungsgemäßen Primernukleotide aus der Nukleotidsequenz GAAGGATCC, wobei die Nukleotidfolge GAA eine sogenannte
25 'clamp' (=Klammer) darstellt und die Nukleotidfolge GGATCC die Schnittstelle für das Restriktionsenzym BamHI repräsentiert. Diese Kopf- bzw. Extensionssequenz hat sich in der Praxis sehr gut bewährt. Prinzipiell kann die Kopfsequenz aber aus jeder beliebigen Nukleotidsequenz bestehen, vorausgesetzt daß diese die Primer-Annealing-Kinetik nicht negativ beeinflußt.

- Die Nukleotidsequenzen der synthetischen Oligonukleotide der RDBH-Sonden sind vorzugsweise so gewählt, daß sie zu der retroviralen Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder zu einem Abschnitt dieser Region korrespondieren, d.h. damit
- 5 übereinstimmen und/oder (im Experiment) hybridisieren können.

- Da die Effizienz einer Oligonukleotid-Synthese mit der Länge des zu synthetisierenden Oligonukleotids abnimmt, ist eine Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens vorgesehen, bei der als immobilisierte RDBH-Sonden jeweils (d.h. je Sonden bzw. je 10 Dot) eine Mischung aus äquimolaren Mengen zweier im Vergleich kurzkettiger synthetischer Oligonukleotide eingesetzt werden. Diese korrespondieren zusammen bzw. hintereinandergelegt zu einem längeren, vorzugsweise etwa 90 Basenpaare (bp) langen Abschnitt der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L.
- 15 In einer Ausführungsform, die sich in der Praxis sehr gut bewährt hat, sind diese beiden kurzkettigen Oligonukleotide annähernd gleich groß bzw. gleich lang, und umfassen vorzugsweise ca. 45 Basenpaare.

- Die Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen und dazugehörigen 20 Figuren und Tabellen näher erläutert.

- Die verwendeten Abkürzungen bedeuten:
- BaEV = Baboon endogenes Retrovirus des Pavians;
- ERV = endogenes Retrovirus,
- 25 ERV9 = endogenes Retrovirus Typ 9.
- GaLV = Gibbonaffen Leukämie Virus;
- HERV = humanes endogenes Retrovirus;
- HIV = humanes Immundefizienz Virus;
- HML = humane Maus Mammatumorvirus-ähnliche Sequenz;
- 30 HPLC = High Performance Liquid Chromatography
- HRV5 = humanes (exogenes) Retrovirus Typ 5;

HTLV-1 = humanes adultes T-Zellen-Leukämie-Virus Typ 1;

LINE = langes, diperses (verstreut liegendes) DNA-Sequenzelement;

MMTV = Mause Mammatumor-Virus;

MoMuLV = Moloney Mäuse LeukämieVirus;

- 5 MOP = Vorwärtsprimer (forward primer) und Umkehrprimer (reversed primer) umfassende Primermischung aus degenerierten Oligonukleotiden

MPMV = Mason Pfizer Affen Virus;

PCR = Polymerase-Ketten-Reaktion

PERV = endogenes Schweine-Retrovirus (porcine endogenous retrovirus);

- 10 PBMNC = periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells);

RDBH = Reverse Dot Blot Hybridisierung

RT = Reverse Transkriptase

Es zeigen:

- 15 Tabelle 1: erfundungsgemäße Retrovirus-Typ-ABD- und -Typ-C-spezifische Primermischungen MOP-ABD und MOP-C, die jeweils Vorwärtsprimer (forward primer) und Umkehrprimer (reverse primer) umfassen und degenerierte Oligonukleotide darstellen. Zur Bescheinigung der degenerierten Oligonukleotidsequenzen ist der standardisierte Einzelbuchstaben-abkürzungscode der IUPAC Nomenklatur verwendet worden (siehe *European Journal of Biochemistry* 150: 15, 1985). Sowohl die Vorwärtsprimer (forward primer) als auch die Umkehrprimer (reverse primer) sind, gemäß der IUPAC Konventionen und bezogen auf den DNA-Strang, in 5'-3' Richtung dargestellt. Der Grad der Degeneration, das heißt mit anderen Worten die Anzahl der verschiedenen, bei der Synthese erhältlichen möglichen konkreten Ausführungsformen dieser Primer, ist jeweils in Form der theoretisch errechneten Anzahl verschiedener Oligonukleotide angegeben.
- 20
- 25

- Tabelle 2: Immobilisierte synthetische retrovirusspezifische Oligonukleotid-Sonden zur Herstellung von Dot-Blot Membranen. Für jeden Fleck bzw. Dot wurde eine Mischung aus äquimolaren Mengen der beiden Partner eines

Oligonukleotidpaars, das zu einem 90 bp langen Abschnitt einer retrovirusspezifischen Reversen Transkriptase korrespondiert, hergestellt. Jeweils 100 Picomole dieser Mischungen wurden in der dem abgebildeten Code entsprechenden Anordnung auf die Membran aufgetragen. Zur internen Standardisierung der Hybridisierung und Autoradiographie wurde eine Verdünnungsreihe menschlicher genomischer DNA (8E - 8H) und von Oligonukleotid-Primer-Mischungen (8I - 8L) auf die Filter aufgebracht. Für jede auf dem Filter eingesetzte Oligonukleotidsequenz ist, soweit verfügbar, die Genbank-Zugriffsnummer und der Erstautor angegeben.

10 Tabelle 3: Klassifizierung von retrovirusspezifischen Oligonukleotid-Dot-Blot-Sonden:

Von 61 repräsentativen Mitgliedern aller bekannten humanen exogenen und endogenen Retroviren wurde die Nukleotidsequenz des jeweiligen Reverse Transkriptase Gens in dem Bereich zwischen den hoch konservierten Domänen V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L für die Synthese von Dot-Blot-Sonden herangezogen (Shih et al. 1989, Donehower et al. 1990). In dem hier dargestellten Experiment wurden 21 retrovirale Nukleotidsequenzen vom Typ ABD (HERV-K Superfamilie), 19 retrovirale Nukleotidsequenzen vom Typ C, 1 retrovirale Nukleotidsequenz vom Typ D und 7 Nukleotidsequenzen mit Verwandtschaft zum humanen Foamy Virus eingesetzt. Ferner wurde eine humane LINE-1 Sequenz (3L) und 6 exogene humane Retroviren (6E - 6J), sowie fünf Sonden, die zu je einem tierischen Säuger-C-Typ-Retrovirus korrespondieren und eine Sonde, die zu einem tierischen Säuger-B-Typ-Retrovirus korrespondiert (7E - 7J), getestet.

15 20 25 Sterne markieren mit HERV Transkripten verwandte Nukleotidsequenzen, die in Patienten mit Multipler Sklerose und Patienten mit systemischer Lupus-Erythematose gefunden wurden.

30 FIG. 1. Lokalisierung von konservierten Aminosäureabschnitten in der aminoterminalen Genregion der Reversen Transkriptase von Retroviren und Retrotransposons. Die Homologie Kernregionen V L P Q G und Y M/V D D

I/V/L L wurden für die Ableitung und Herstellung der degenerierten Oligonukleotide der erfindungsgemäßen Primermischungen (MOP-ABD bzw. MOP-C) eingesetzt.

5 FIG. 2. Schematische Darstellung des erfindungsgemäßen RT-PCR/RDBH Verfahrens.

FIG. 3. HERV Expressionsmuster in humanen PBMNCs eines gesunden Blutspenders.

10 Die Durchführung der Reversen Dot-Blot-Hybridisierung (RDBH) erfolgte unter Standardbedingungen mit DNA-Fragmenten, die mit den erfindungsgemäßen Primermischungen aus degenerierten Oligonukleotiden, nämlich MOP-ABD (Tabelle A) bzw. MOP-C (Tabelle B) bzw. der Kombination MOP-ABD/MOP-C (Tabelle C) amplifiziert worden waren.

15

FIG. 4. HERV Expression in humanen PBMNCs nach Zugabe eines klonierten DNA-Fragments, das ein PERV RT-Gen enthält. Weniger als 10 Kopien einer endogenen Schweineretrovirus (PERV) Typ A DNA (Patience et al. 1997) konnten unter standardisierten Versuchsbedingungen noch nachgewiesen und identifiziert werden (Tafel A, Filter Code 7F). Unter den angewendeten Stringenzbedingungen wurde keine Kreuzhybridisierung von HERVs mit schweinespezifischen Amplifikationsprodukten, die von einer Schweine-DNA-Matrize gewonnen wurden, beobachtet (Tafel B).

20

Beispiel 1: RNA Präparation

Von peripheren mononukleären Blutzellen (PBMNC = peripheral blood mononuclear cells) eines gesunden Blutspenders wurde die gesamt-RNA gemäß dem Guanidin 30 Isothiocyanate/Cäsium Chlorid (GIT/CsCl) Ultrazentrifugations-Protokoll von Sambrook et al. (1989) extrahiert und in mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem

destillierten Wasser gelöst. Anschließend wurde die mRNA mit herkömmlichen Methoden angereichert, z.B. unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Anreicherungskits 'Dynabeads™ paramagnetic Partikel' nach den Anweisungen des Herstellers (Dynal, Hamburg, Germany). Die Nukleinsäure-Konzentration wurde mittels Spektrophotometrie bei 260 nm bestimmt. Zur Überprüfung auf etwaige Kontaminationen mit genomicscher DNA wurden 50 ng von jeder mRNA-Präparation direkt, d.h. ohne zunächst einer reversen Transkription unterworfen worden zu sein, in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischungen aus degenerierten Oligonucleotiden (MOP) eingesetzt. Nur solche Präparationen, die keine DNA-Spuren aufwiesen, wurden für die eigentliche PCR verwendet. Diejenigen Präparationsansätze, bei denen eine DNA-Kontamination nachweisbar war, wurden so lange mit 100 Einheiten/µg RNase-freier DNase (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in 100 mM Natrium-Azetat pH 5.0, 5 mM MgSO₄ behandelt, bis die Kontroll-PCR ein negatives Ergebnis lieferte.

15

Beispiel 2: Herstellung von erfindungsgemäßen Primermischungen MOP-ABD und MOP-C für die PCR.

In Tabelle 1 sind bevorzugte MOP-ABD und MOP-C-Primermischungen unter Verwendung der in Fachkreisen bekannten und geläufigen IUPAC-Nomenklatur dargestellt. Jede der Primermischungen enthält eine Mehrzahl verschiedener Vorwärtsprimer (forward primer) und Umkehrprimer (reverse primer): Die Vorwärtsprimer (forward primer) der Primermischung MOP-ABD weisen die allgemeine Nukleotidsequenz GAAGGATCCARAGTNYTDYCHCMRGHH auf, die 3456 Degenerationen, d.h. 3456 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt. Die Umkehrprimer (reverse primer) der Primermischung MOP-ABD weisen die Nukleotidsequenz GAAGGATCCNWDDMKDTYATCMAYRWA auf, die 27648 Degenerationen, d.h. 27648 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt. Die Vorwärtsprimer (forward primer) der Primermischung MOP-C sind durch die allgemeine Nukleotidsequenz GAAGGATCCTKKAMMSKVYTRCYHCARGGG gekennzeichnet, die 3072 Degenerationen, d.h. 3072 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt,

und die Umkehrprimer (reverse primer) der Primermischung MOP-C weisen die Nukleotidsequenz GAAGGATCCMDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA auf, die 8192 Degenerationen, d.h. 8192 verschiedene konkrete Nukleotidsequenzen umfaßt.

Diese Primer-Nukleotidsequenzen korrespondieren zu den hoch konservierten

- 5 Homologie Kernregionen V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L innerhalb des Reverse Transkriptase (RT) Gens aller bekannten humanen endogenen und exogenen Retroviren (siehe Fig. 1 und die Publikationen von Xiong und Eickbush 1990, Shih et al. 1989 und Donehower et al. 1990). Der als "Kopf" bezeichnete Anfang der Primernukleotidsequenzen an dem 5' Ende der jeweiligen retroviruspezifischen Core-
10 Homologie-Region, nämlich die Nukleotidfolge GAAGGATCC ist eine Extensionssequenz, die aus der sogenannten "clamp"-Sequenz GAA und der *BamHI* Restriktionsstelle GGATCC besteht.

Anstelle der hier beschriebenen "clamp"-Sequenz und der hier beschriebenen *BamHI* Restriktionsstelle kann auch eine andere "clamp"-Sequenz und/oder eine andere

- 15 Schnittstelle für ein Restriktionsenzym zur Erzeugung der "Kopf" bzw. Extensionsequenz der jeweiligen Primer verwendet werden. Gundsätzlich gilt allerdings, daß die Länge dieser "Kopf" bzw. Extensionsequenz nicht mehr als die Hälfte der Primergesamtlänge betragen sollte.

- 20 Die Primermischung MOP-ABD erlaubt die separate Amplifikation der Retroviren vom Typ A, B und D, und die Primermischung MOP-C erlaubt die separate Amplifikation der Retroviren vom Typ C. Beide Primermischungen können ohne weiteres kombiniert werden und ermöglichen damit die Amplifikation aller Retrovirstypen (Typ A, B, C, und D).

25

Beispiel 3: Herstellung der Sonden für die Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH)

Aminosäuresequenz-Vergleiche haben gezeigt, daß die für die Reverse Transkriptase

- 30 kodierenden Gene aller Retroviren und der meisten Retroelemente hoch konservierte Homologie Kernregionen aufweisen (Poch et al. 1989, Shih et al. 1989, McClure 1993,

Donehower et al. 1990, Xiong and Eickbush 1990). Zwei der meist konservierten Aminosäuresequenzabschnitte sind die Aminosäuremotive V L P Q G und Y V/M D D I/V/L L (Fig. 1). Der Sequenzbereich zwischen diesen Motiven umfaßt etwa 90 Basenpaare (d.h. ist etwa 90 bp lang) und weist eine deutlich geringere Homologie

- 5 innerhalb der verschiedenen Retrovirus-Familien auf. Dieser Bereich wurde zur Herstellung von retrovirusspezifischen Sonden für die RDBH herangezogen. Dabei wurde wie folgt vorgegangen: zunächst wurden allgemein zugängliche Nukleotidsequenz-Datenbanken nach Nukleotidsequenz durchsucht, die mit der Nukleotidsequenz der Reversen Transkriptase (RT) verwandt sind. Sequenzen von exogenen und endogenen Retroviren wurden gemäß der geltenden Nomenklatur 10 klassifiziert und hinsichtlich ihrer RT-Homologie weiter in Unterklassen untergliedert (Daten hier nicht dargestellt). Einige bisher unpublizierte HERV-Sequenzdaten wurden freundlicherweise von Martin Herrmann (1998) zur Verfügung gestellt, einige wurden selbst charakterisiert. Von allen bekannten Retrovirus-Familien wurden repräsentative 15 Mitglieder ausgewählt (Tab. 3) und aus deren jeweiligem RT-Gen, jeweils im Bereich zwischen den hoch konservierten RT-Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L, jeweils ein ca. 90 bp langes Fragment isoliert und als Vorlage zur Synthese entsprechender RDBH-Sonden verwendet. Da die Effizienz einer Oligonukleotid-Synthese mit der Länge des zu synthetisierenden Oligonukleotids abnimmt, wurden 20 jeweils anstelle eines 90 pb langen Oligonukleotids (90-mer) zwei 45 bp lange Oligonukleotide (45-mers) synthetisiert und als Paar eingesetzt. Jeder Dot (Fleck) des auf die hier beschriebene Weise hergestellten Dot-Blots entspricht einer äquimolaren Mischung aus gleichen Anteilen eines Paares von 45mers aus der Gruppe der Paare, die in 25 Tabelle 2 aufgelistet sind.

25

Beispiel 4: Herstellung von Reverse-Dot-Blot-Membranen für die RDBH

Retrovirus-spezifische Oligonukleotide, die zu einem 90 bp langen Fragment der hoch konservierten Domäne des RT-Gens korrespondieren, wurden synthetisiert und mittels

- 30 HPLC gereinigt. Für jede zu testende retrovirale Nukleotidsequenz wurden äquimolare Mengen der beiden Partner eines gemäß Beispiel 3 hergestellten Paares von 45-mer

Oligonucleotiden zusemmengemischt und 100 Picomole dieser Paarmischung wurden in 5x SSC (1x SSC = 0,15M NaCl plus 0,015 M Natriumcitrat) gelöst und anschließend manuell oder maschinell, mit Hilfe einer handelsüblichen Dot Blot Apparatur (beispielsweise Minifold I dot blotter SRC96D von Schleicher & Schuell, Dassel

- 5 Germany), auf eine handelsübliche Filtermembran (beispielsweise eine ZETApore™ GT blotting Membran von BioRad, Hercules CA USA) aufgetropft. Die Filter wurden in 2x SSC äquilibriert, die Oligonucleotide wurden irreversibel immobilisiert, vorzugsweise mittels UV-Crosslinking (beispielsweise mit dem kommerziell erhältlichen UV-Strahler Stratalinker™ von Stratagene, La Jolla, CA USA), und die Filter wurden anschließend an der Luft getrocknet.

10 Nach erfolgter Hybridisierung der Amplifikat-DNA an die kovalent auf den Membranen gebundenen RDBH-Sonden kann gebundene Amplifikat-DNA von der Dot-Blot Membran durch alkalische Denaturierung wieder gelöst werden und bei Bedarf reamplifiziert werden, um ausreichende Mengen an doppelsträngiger DNA z.B. für eine

- 15 Klonierung und nachfolgende Sequenzanalyse der betreffenden Amplifikate zu erhalten.

Beispiel 5: Reverse Transkription und Polymerase -Ketten-Reaktion (RT-PCR)

Von jedem Versuchsansatz wurden 500 ng DNA-freie mRNA in 50 µl einer Lösung aus

- 20 20 mM Tris/HCl pH 8,4, 10 mM Dithiothreitol (DTT), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM von jedem Desoxynukleosidetriphosphat (dNTP), 10 Einheiten RNasin (Promega) 30 pmol Random Hexamere Oligonucleotides (Promega) and 20 Einheiten an MLV Reverse Transkriptase (GIBCO-BRL) bei 37 °C für 1 Stunde revers transkribiert. Anschließend wurden die Ansätze denaturiert, beispielsweise durch Hitzebehandlung bei
- 25 95°C für 5 Min., und bis zur weiteren Verwendung bei - 20 °C gelagert.

Für die erfindungsgemäßen MOP-PCRs (mit MOP-ABD und/oder MOP-C) wurde jeweils ein Zwanzigstel Volumen (1/20) der cDNA-Reaktion in 50 µl einer Lösung aus 10 mM Tris/HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,001% Gelatine, 50 pmoles der betreffenden erfindungsgemäßen Primermischung(en) aus degenerierten

- 30 Oligonucleotiden, 0,25 mM von jedem Desoxynukleosidetriphosphat, und 1,25 Einheiten Taq Polymerase (GIBCO-BRL) amplifiziert. Die Versuchsansätze wurde auf Eis

zubereitet und mit 50 μ l Mineralöl (Sigma) überschichtet. Die Amplifikation wurde in einem handelüblichen DNA-Thermal-Zykler (beispielsweise der Firma Perkin Elmer Cetus) unter Verwendung der fachbekannten "Hot-Start"-Methode durchgeführt, wobei 30 Zyklen durchlaufen wurden, die jeweils die folgenden Parameter aufwiesen: 30 Sek.

- 5 bei 94 °C, 4 Min. bei 50 °C und 1 Min. bei 72 °C. Zum Abschluß wurde ein Extensionsschritt bei 72°C für 7 Min. durchgeführt. Die Annealingzeit, d.h. die Zeit zur Doppelstrangbildung, betrug vier Minuten, um zu gewährleisten, daß die überwiegende Zahl der in der erfindungsgemäßen Primermischung enthaltenen (degenerierten Oligonukleotid-) Primer die zu ihnen homologen Matrizen finden. Die Extensionssequenz der erfindungsgemäßen Primer hat einen stabilisierenden Effekt auf die Primer-Matrizen-Bindungskinetik, so daß die in dem ersten PCR-Zyklus gebildeten PCR-Produkte in den folgenden Zyklen wesentlich effizienter amplifiziert werden. Damit geht der Vorteil einher, daß retrovirale Matrizen selbst dann amplifiziert werden (können), wenn der exakt dazu passende Primer nicht in der erfindungsgemäßen 10 Primermischung vorhanden ist. Darüber hinaus ist eine schnelle Klonierung der Amplifikationsprodukte z.B. für eine Sequenzüberprüfung oder für die Charakterisierung neuer RT-verwandter Nukleotidsequenzen möglich.
- 15

- Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden im Hinblick auf die Primermenge, die Annealingzeit (Doppelstrangbildungszeit) und die Annealingtemperatur (Doppelstrangbildungstemperatur) optimiert, um eine optimale Produktausbeute zu erzielen..

- 20 Um Produkt-Kontaminationen aus vorangegangenen PCR-Experimenten und etwaige Spuren von genomischen DNA-Kontaminationen in den verwendeten Lösungen nachzuweisen, wurde eine Kontrollreaktion durchgeführt, bei der die Matrizen weggelassen wurden. Die Amplifikationsprodukte wurden auf präparativen 2.5 % TBE 25 Agarose Gelen elektrophoretisch aufgetrennt und mit Ethyldiumbromid angefärbt. Banden mit einer Größe zwischen 100 und 150 bp, die mit den amplifizierten retroviralen RT-Nukleotidsequenzen korrespondierten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung eines handelsüblichen Reinigungssets (beispielsweise des GENECLEAN II kits von BIO 101 Inc., Vista CA USA) 30 aufgereinigt. Für die RDBH wurden ca. 50 ng der gereinigten Fragmente mit $[\alpha$ -

³²P]dATP (3000 Ci/mmol) markiert. Die Markierung wurde mittels des Megaprime DNA labelling kit (Amersham Pharmacia Biotech, England) durchgeführt, sie kann aber selbstverständlich ebensogut auch mit Hilfe anderer gebräuchlicher Markierungsverfahren erfolgen.

5

Beispiel 6: Reverse Dot Blot Hybridisierung (RDBH)

Sowohl für den Nachweis als auch für die Identifikation der amplifizierten Produkte wurde die Methode der RDBH angewendet. Diese RDBH-Methode ermöglicht eine strikte Diskriminierung (Unterscheidung) von PCR-Produkten, so daß gegebenenfalls vorhandene falsch amplifizierte Nukleotidsequenzen, die keine Verwandtschaft zu Nukleotidsequenzen von retroviralen RT-Genen aufweisen, ohne Bedeutung sind. Die hohe Stringenz der RDBH wird durch den Einsatz der erfindungsgemäßen synthetischen HERV-spezifischen Oligonukleotide erreicht, die als RDBH-Sonden auf die Dot Blot 10 Filtermembran aufgebracht sind. Der erfindungswesentliche Vorteil dieser RDBH-Sonden- Oligonukleotide besteht darin, daß sie keine der Nukleotidsequenzen enthalten, die die degenerierten Oligonukleotide der erfindungsgemäßen PCR-Primermischungen MOP-ABD und MOP-C aufweisen (vgl. z.B. Tab. 1) und sich dadurch grundsätzlich von diesen PCR-Primer-Oligonukleotiden unterscheiden. Dieser grundsätzliche Unterschied 15 zwischen den RDBH-Sonden-Oligonukleotiden und den PCR-Primer-Oligonukleotiden gewährleistet, daß eine Hybridisierung zwischen einer RDBH-Sonde und einem PCR-Amplifikat nur dann stattfindet, wenn die zwischen den beiden Primern befindliche Nukleotidsequenz mit dem betreffenden RDBH-Sonden-Oligonukleotid korrespondiert, d.h. wenn diese Nukleotidsequenz mit dem betreffenden RT-Nukleotidsequenzabschnitt 20 identisch ist oder sich nur in wenigen Nukleotiden (n=3) unterscheidet. Im Idealfall sollten die hybridisierenden DNA-Sequenzen völlig identisch sein. In der Praxis unter den gegebenen Hybridisierungsbedingungen sind Unterschiede von zwei bis drei Nukleotiden tolerierbar. Infolgedessen können unter hoch stringenten Bedingungen selbst eng verwandte retrovirale Nukleotidsequenz noch voneinander unterschieden und 25 eindeutig identifiziert werden.

Zur Vermeidung von Kreuz-Hybridisierungen wurden die optimalen Stringenzbedingungen für die RDBH bestimmt, indem Hybridisierungstemperatur, Waschtemperatur und Salzkonzentrationen variiert wurden. Die Prähybridisierung der Reverse-D-Blot-Filters wurde in verschweißten Plastiktaschen in 0,25 M Na_2HPO_4 pH 7,2, 7% Natriumdodecylsulfate (SDS), 1 mM EDTA bei 50 °C für mindestens 3 Std. durchgeführt. Für die eigentliche Hybridisierung wurden dieselben Lösungen mit 5×10^5 CpM der markierten PCR-Amplifikate pro ml Hybridisierungsvolumen versetzt und für 16 Std. unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal in 40 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2, 5% SDS, 1 mM EDTA und zweimal in 40 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2, 1% SDS, 1 mM EDTA, (jeweils ca 30 Min.) gewaschen. Die Untersuchung und Auswertung der Reaktion erfolgte mittels Autoradiographie.

**Beispiel 7: Analyse des HERV-Transkriptionsmusters in humanen PBMNCs
mittels des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens**

Gemäß dem in Fig. 2 dargestellten Verfahrensschema wurde zunächst aus humanen PBMNCs die Gesamt-RNA wie in Beispiel 1 beschrieben mittel gängiger Isolationstechniken extrahiert. Diese Gesamt-RNA wurde zunächst einer RT-PCR/RDBH unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischung MOP-ABD unterworfen. Dabei wurden nahezu ausschließlich Typ B-verwandte HERVs, d.h. Mitglieder der HERV-K Überfamilie, nachgewiesen (Fig. 3A). Die meisten Transkripte stammten von Mitgliedern der HERV-K -Untergruppen HML-2, -3, -4, und -6. Darüber hinaus wurden Signale von HERV-KC4 verwandten Elementen (8A, 8B) und von einer weiteren HERV-K verwandten Nukleotidsequenz, die keiner der HML-Untergruppen zugeordnet werden konnte (5F), gefunden. Das beobachtete Expressionsmuster steht in Übereinstimmung mit bereits publizierten Studien, die im Ergebnis eine differenzierte Expression von HML-Elementen in humanen Geweben feststellten (Medstrand et al. 1993, Andersson et al. 1996). Außerdem wurden geringe Mengen des mit dem humanen Foamy Virus verwandten Elements HERV-L gefunden, womit die hohe Spezifität der MOP-ABD Primermischung für Typ- ABD-verwandte Elemente gezeigt ist.

Parallel zu diesem Versuch wurde die Gesamt-RNA von PBMNCs einer RT-PCR/RDBH unter Verwendung der erfindungsgemäßen Primermischung MOP-C unterworfen. Im Unterschied zur MOB-ABD-Primermischung ist die MOP-C-Primermischung nicht nur zum Priming von Typ-C-verwandten Nukleotidsequenz 5 geeignet, sondern amplifiziert auch HERV-K-verwandte Elemente der HML-2, HML-4, und HML-6 Untergruppen. Es war eine starke Expression von HERV-E4-1-verwandten Elementen (2H and 2I), von humanem Foamy Virus verwandten HERV-L Elementen (1E bis 1K) und von ERV9-verwandten HERVs (4E bis 4G, und 4I) nachweisbar. Obwohl in allen RDBH-Reaktionen die gleichen Mengen an radioaktiv markierten PCR- 10 Amplifikaten eingesetzt wurden, ergaben die auf den Membranen vorhandenen genomischen DNA-Sonden (8E bis 8H) nach der Hybridisierung mit MOP-C erzeugten PCR-Amplifikaten wesentlich stärkere Signale als nach der Hybridisierung mit MOP-ABD erzeugten PCR-Amplifikaten. Diese Befunde weisen darauf hin, daß das humane Genom signifikant mehr Kopien von Typ C-verwandten HERV-Elementen als von Typ- 15 B-verwandten HERV Elementen enthält.

Zum Nachweis aller retroviralen Nukleotidsequenzen in einem einzigen Experiment wurden die MOP-ABD- und die MOP-C-Primermischungen in Kombination aus äquimolaren Mengen in einem erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahren eingesetzt. 20 Dieses Experiment resultierte in einer überwiegenden Amplifikation von Typ C-verwandten Nukleotidsequenzen, während die ABD-Typ-Sequenzen unterrepräsentiert blieben (Daten hier nicht dargestellt). Aus diesem Grund wurden separate PCR Verfahren mit MOP-ABD-Primermischungen einerseits und MOP-C-Primermischungen andererseits durchgeführt und die gereinigten Amplifikationsprodukte beider Verfahren 25 in äquimolaren Mengen kombiniert. Mit dieser Amplifikationsproduktkombination wurde dann die RDBH durchgeführt. Dabei wurde das in Fig. 3C dargestellte Signalmuster erhalten, das der theoretischen Kombination der Signalmuster der RDBH-Verfahren mit MOP-ABD-Amplifikaten gemäß Fig. 3A einerseits und mit MOP-C-Amplifikaten gemäß Fig. 3B andererseits entspricht. Dieser Befund zeigt, daß das erfindungsgemäße 30 PCR/RDBH-Verfahren insbesondere als qualitatives Nachweisverfahren überragend gut geeignet ist.

Beispiel 8: Nachweis der Sensitivität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens

Zur Überprüfung der Sensitivität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens im Hinblick auf einen angestrebten praktischen Einsatz in der Routinediagnostik, z.B. zum

- 5 Nachweis bzw. Ausschluß einer etwaigen Interspezies-Transmission von PERV mit Xenotransplantaten, wurden Verdünnungsreihenexperimente unter Verwendung von cDNA aus humanen PBMNCs und abnehmenden Konzentrationen eines klonierten DNA-Fragments, das eine PERV RT -kodierende Region enthält (Takeuchi et al. 1998), durchgeführt. Unter standardisierten Versuchsbedingungen war in der cDNA, die aus 25 ng humaner PBMNC mRNA gewonnenen worden war, selbst noch die so geringe Menge von 10 Kopien PERV DNA nachweisbar (siehe FIG. 4A, Filter Code 7F).

Irgendwelche Kreuzhybridisierungen zwischen humanspezifischen Amplifikaten und PERV-spezifischen RDBH-Sonden wurden nicht beobachteten (vgl. Fig. 3C, Filter Code

- 15 7F). Auch bei der Durchführung des PCR/RDBH-Verfahrens mit reiner Schweine-DNA als PCR Matrize (FIG. 4B) waren keine Kreuzhybridisierungen zwischen den Schweine-Amplifikaten und den humanen endogenen oder exogenen retroviralen Nukleotidsequenzen nachweisbar. Diese Ergebnisse sind ein starkes Indiz für die sehr hohe Interspezies-Spezifität des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens.

- 20 Die in dem hier dargestellten Versuch gewonnenen Ergebnisse, nämlich das mit der murinen Typ-C Retrovirus-spezifischen Sonde (7 I) erhaltene schwache Signal, weisen überraschenderweise darauf hin, daß in der Schweine-Genom-DNA ebenfalls PERVs mit einer Homology zu MoMuLV enthalten sind. Weitere Ergebnisse dieses Versuchs, nämlich die Beobachtung eines schwachen Signals mit humanen DNA-Sonden (8E, 8F)

- 25 weisen ebenfalls überraschend darauf hin, daß auch das humane Genom möglicherweise PERV verwandte Nukleotidsequenzen enthält, die kein Pendant auf der eingesetzten Dot Blot Membran haben und infolgedessen vermutlich bisher noch uncharakterisiert sind. Dieser Befunde verdeutlichen den außerordentlichen Vorteil des erfindungsgemäßen PCR/RDBH-Verfahrens, nämlich die Ermöglichung des Auffindens, der Isolierung und

- 30 Klonierung von bisher unbekannten DNA -Fragmenten.

A n s p r ü c h e

1. Verfahren zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem Untersuchungsgut, gekennzeichnet durch Art und Reihenfolge der nachstehend genannten Maßnahmen:
 - Isolierung der Nukleinsäuren, nämlich DNS- und/oder RNS, aus dem Untersuchungsgut,
 - Durchführung einer PCR mit den isolierten DNS oder einer RT-PCR mit den isolierten von RNS unter Verwendung von einer oder beiden der nachfolgend dargestellten, jeweils aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehenden Primermischungen MOP-ABD und MOP-C, deren Vorwärtsprimer und Umkehrprimer degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 bis NO. 4 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen sind, wobei die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 1, nämlich: "Kopf"-ARAGTNYTDYCHCMRGGH, mit 3456 Degenerationen aufweisen,
 - die Umkehrprimer der Mischung MOP-ABD die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, nämlich: "Kopf"-NWDDMKDTYATCMAYRWA, mit 27648 Degenerationen aufweisen,
 - die Vorwärtsprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 3, nämlich: "Kopf"-TKKAMMSKVYTRCYHCARGGG, mit 3072 Degenerationen aufweisen, und
 - die Umkehrprimer der Mischung MOP-C die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 4, nämlich: "Kopf"-MDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA, mit 8192 Degenerationen aufweisen,
- wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer (clamp)-Sequenz am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt,
- Aufreinigung der erhaltenen (RT-) PCR-Amplifikate und Einsatz derselben in einem RDBH-Verfahren unter Verwendung immobilisierter RDBH-Sonden, die

jeweils (je Sonde) synthetische Oligonukleotide umfassen, deren Nukleotidsequenz der retroviralen Nukleotidsequenz des retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens der mit dem betreffenden Dot nachzuweisenden Virusart oder einem Abschnitt einer solchen viralen Nukleotidsequenz entspricht und keine Überlappung mit den Nukleotidsequenzen der in der PCR oder RT-PCR eingesetzten Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) aufweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der "Kopf"-Abschnitt der in den Sequenzprotokollen dargestellten Nukleotidsequenzen die Nukleotidsequenz GAAGGATCC aufweist.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet daß die Nukleotidsequenzen der synthetischen Oligonukleotide der RDBH-Sonden zu der retroviralen Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder zu einem Abschnitt dieser Region korrespondieren.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß als immobilisierte RDBH-Sonden jeweils (je Sonden bzw. je Dot) eine Mischung aus äquimolaren Mengen der beiden Partner eines Paars synthetischer Oligonukleotide, das zusammen (als Paar) zu einem vorzugsweise 90 bp langen Abschnitt aus der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L korrespondiert, eingesetzt wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Partner des Paars synthetischer Oligonukleotide annähernd gleich groß bzw. gleich lang, vorzugsweise ca 45 bp lang sind.
6. Aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehende Primermischung für die PCR, deren Vorwärtsprimer und Umkehrprimer

degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 1 und SEQ ID NO. 2 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen sind, wobei die Vorwärtsprimer die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 1, nämlich: "Kopf"-ARAGTNYTDYCHCMRGGH, mit 3456 Degenerationen und die Umkehrprimer die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 2, nämlich: "Kopf"-NWDDMKDTYATCMAYRWA, mit 27648 Degenerationen aufweisen, und wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer (clamp)-Sequenz am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt und vorzugsweise die Nukleotidsequenz GAAGGATCC aufweist.

7. Aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehende Primermischung für die PCR, deren Vorwärtsprimer und degenerierte Oligonukleotide mit den in den Sequenzprotokollen SEQ ID NO. 3 und SEQ ID NO. 4 gemäß der IUPAC-Nomenklatur wiedergegebenen Nukleotidsequenzen sind, wobei die Vorwärtsprimer die Nukleotidsequenz SEQ ID NO. 3, nämlich: "Kopf"-TKKAMMSKVYTRCYHCARGGG, mit 3072 Degenerationen, und die Nukleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO. 4, nämlich: "Kopf"-MDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA, mit 8192 Degenerationen aufweisen, und wobei "Kopf" für eine Nukleotidsequenz steht, die eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym und eine sog. Klammer (clamp)-Sequenz am 5'-Ende dieser Schnittstelle umfaßt Nukleotidsequenz GAAGGATCC aufweist.
8. Reverse-Dot-Blot-Hybridisierungs-Sonde, bestehend aus einem oder mehreren synthetischen Oligonukleotiden, dessen/deren Nukleotidsequenz(en) mit der Nukleinsäureregion eines retroviruspezifischen Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L oder mit einem Abschnitt dieser Nukleinsäureregion korrespondiert/korrespondieren.

9. Reverse-Dot-Blot-Hybridisierungs-Sonde nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonde aus äquimolaren Mengen zweier synthetischer Oligonukleotide besteht, die zusammen, hintereinandergereiht zu einem vorzugsweise 90 bp langen Abschnitt aus der Nukleinsäureregion des Reverse-Transkriptase-Gens zwischen den hoch konservierten Motiven V L P Q G und Y M/V D D I/V/L L korrespondieren.
10. Diagnosekit zum spezifischen Nachweis und zur Identifizierung retroviraler Nukleinsäuren / Retroviren in einem beliebigen Untersuchungsgut, umfassend wenigstens eine der aus Vorwärtsprimern (forward primer) und Umkehrprimern (reverse primer) bestehenden Primermischungen für die PCR gemäß Anspruch 6 und/oder Anspruch 7 und wenigstens eine Reverse-Dot-Blot-Hybridisierungs-Sonde gemäß Anspruch 8 oder Anspruch 9.

Tabelle 1

| Primer | Nukleotidsequenz | | Degeneration |
|---------|------------------|--|--------------|
| MOP-ABD | Vorwärts- | <u>GAAGGATCC</u> ARAGTNYTDYCHCMRGGH | 3456 |
| | Umkehr- | <u>GAAGGATCC</u> NWDDMKDTYATCMAYRWA | 27648 |
| MOP-C | Vorwärts- | <u>GAAGGATC</u> CTKKAMMSKVYTRCYHCARGGG | 3072 |
| | Umkehr- | <u>GAAGGATCC</u> MDVHDRBMDKYMAYVYAHKKA | 8192 |

31

Tabelle 2

32

| Code | Quelle | Sonde | Oligonukleotidsequenz (5' ->3') |
|------|---------------------------------|----------|--|
| 1A | U35102, Medstrand et al. 1993 | HML-1 | ATGCTAAATAGCCCCAACTGTTTGTAAACTTATGTCAAGAAAGCTAATGTTAAATAGCCCCAACTTATGTCAAAACCTATGTTGGAAAGTT |
| 1B | S77579, Levebvre et al. 1995 | SEQ29 | ATGTTAAATAGCCCCAACTTATGTCAAAACCTATGTTGGAAAGTTATTAAGCCAGTTAGAGAAACAGTTTAAATGTTATAGTATTCAT |
| 1E | G895836, Cordonnier et al. 1995 | HERV-L | TATATCAACTCTCGGCTTGTGTCATAATCTTATTCAGGTGATCTTGATCACTTTCACTGCCACAAAGATAATCACACTGGTCATTAC |
| 1F | Hermann 1998 | SEQ39 | GTATATCAACTCTCCAGCTTGTGTCATCATCTTATTCAGAGATACTTGATCACTTTCACTCTGCAAGATAATCATGCTGGTCATTAC |
| 1G | Hermann 1998 | SEQ40 | TTATATCAACTCTCAGCTTGTGTCATAATCTTATTCGGAGAGACCTTGATCGCTTTCGCTTCCGAAGATAATCACACTGGGTGTTA |
| 1H | Hermann 1998 | SEQ45 | TATATCAGTTATCTGGCTTGTGACGTAATCTTATTTGGAGATCTAGATAACCTTTCACTTCCACAAAGATAATCACACTGGTCATTAC |
| 1I | Hermann 1998 | SEQ48 | TATATCAACCTCCAGCTTGTGTTATAATTATTCAGAGAGATCTTGATCACTTTTGCTTCCACAAAGATAATCACACTGATTGCTTACA |
| 1J | Hermann 1998 | SEQ51 | TGTATCAACCTCTGGCTTGTGTCATAATCTTACCTGGAGATCTTGATCGCTTTCGCTTCCACNAAGATAATCACACTGGTCATTAT |
| 1K | Hermann 1998 | SEQ58 | TATATCAACCTCCAGTTTGTGTCATAATCTTACTGTCAGAGACCTTGATCACTTTTGCTTCCATAAAGACATCACACTGGCCATTAC |
| 2A | M14123 | HERV-K10 | ATGCTTAATPAGTCCAACATATTGTCAGACTTTGTAGETGAGCTTTCACCAAGAAAGTTTCAAGCTGTATATTTAGCTGGAGAT |
| 2B | Ono et al. 1986 | SEQ | ATGCTTAATPAGTCCAACATATTGTCAGACTTTGTAGETGAGCTTTCACCAAGAAAGTTTCAAGCTGTATATTTAGCTGGAGAT |
| 2B | U87592 | U87592 | ATGCTTAATPAGTCCAACATATTGTCAGACTTTGTAGETGAGCTTTCACCAAGAAAGTTTCAAGCTGTATATTTAGCTGGAGAT |
| 2E | Zsiros et al. 1998 | PCR TK1 | TTTAAAAAAACTCCCCAACCTTACCCCTTTGGGAGCCCTCAACAGGGATCTTATACCAATTCTGAGCCAGTAACCCCTCACTGCACTCTCCAG |
| 2E | U12970 | PCR TK6 | TTTAAAAAAATTCGCCAACCTTCTGAGCCAGTCCCCCTAACTGTACTCTTCTCACTTCAACCTTCTGAGCCAGTCCCCCTAACTGTACTCTTCTCA |
| 2F | Haltmeier et al. 1995 | U12969 | CTTCAAGAAACTCCCCAACCTTACCCCTTACCTGAGCTGCTGCTGCTCCAG |
| 2F | Haltmeier et al. 1995 | U12969 | TTTCAAGAAACTCCCCAACCTTACCCCTTACCTGAGCTGCTGCTGCTCCAG |
| 2H | M10976 | HERVE41 | TTTCAAGAAACTCCCCAACCTTACCCCTTACCTGAGCTGCTGCTGCTCCAG |
| 2H | Repask et al. 1985 | | CCCTCCAGAAAGTTCCCCAACCTTACCCCTTACCTGAGCTGCTGCTGCTCCAG |
| 2I | Hermann 1998 | SEQ32 | TTTCAAGAAACTCCCCAACCTTACCCCTTACCTGAGCTGCTGCTGCTCCAG |
| 2J | AF026252, Lindeskog et al. 1998 | HERV-H | TTTCAAGAAACTCCCCAACCTTACCCCTTACCTGAGCTGCTGCTGCTCCAG |
| 2K | Hermann 1998 | SEQ61 | TTTCAAGAAACTCCCCAACCTTACCCCTTACCTGAGCTGCTGCTGCTCCAG |

| | | | |
|----|----------------------------------|----------------|--|
| 2L | Hermann 1998 | SEQ66 | TTCAGAGACAGCCCCATTACTTGTCAAGCTTCTCATGAT CTACTTTCTTCCATTCATCTGTCTCACCTTATTCAATATATG |
| 3A | U35236, Medstrand et al. 1993 | HM-3 | ATGGTAAACAGTCCAAACAAATTGGCCAGACTTATAATGGCAAGCAA TTGAACCTACTCTTAAAAAATTTCAACAGTGTACATTATTCTATT |
| 3B | S66676, Kalden und Hermann, 1993 | HERV1 SLE | ATGATAAAACAGTCCAAACAAATTGGCCAGGCATATGTAGGGCAAC AAWTGAACCTACTGTGTAACAAATTTCAGTGTACATTATTCTATT |
| 3C | S77583 Leebvre et al. 1995 | RT244 | ATGGTAAACAGTCCAAACAAATTGGCCAGTCATATGTGGGCCAGCA ATTAACCTACTCTTAAAAAATTTCAACAGTGTACATTATTCTATT |
| 3D | Hermann 1998 | SEQ26 | CGTGTAAACAGTCCGACTATTGCCAGAAGTATGTGGGCCAG CAATTGAACTACTGTAAAAAATTTCAGTGTACATTATTCTATT |
| 3E | U27240 | ERV-FRD | TTGAGATAAGTCCCATTGGCAAGCTTGGCTAGATA TTTGCAGGACCTAAAGTCTTGTGGCAAGCTTGGCTAGATAATT |
| 3F | Hermann 1998 | SEQ46 | TTCAAGATACTGCCCATTGGCAAGCTTGGCTAGATAATT TGCAGGAACTTAAGTCTTGTGGCAAGCTTGGGCATCTCCTACAGTACA |
| 3H | M92067 | HERV-1 | TTCATGGATTCCCCAACCTTTGGCAAAATTAGCTTCAATAT CTAGACAAAGTTCTGTTCCAAACAAATTAGCTGTCTCAATAT |
| 3I | U27241 | HERV-IP (T47D) | TTCACAGACTCCCTTATTTGGTAATTTTGAACACAAGC ATTAGAAAAGTTTCATTCAGAACAAATTAGCTGTCTCAG |
| 3J | Hermann 1998 | SEQ65 | AGACTCCCTTATCTTGGTCATCCAAAGCAATTAGCTGTCTCAG AAAAAGTGGTCACTCCATCCAAAGCAAAATTAGCTGTGGAAAGTTCTG |
| 3L | McMillan and Singer 1993, M80343 | LINE-1 | TGCCCTCTCCACCATCTTCAATTCAAGAACAAATTAGCTGTCTCAG GCCAGGGCAATTAGCAGGAGAAGGAATAAAGGGTATTCATTA |
| 4A | Hermann 1998 | SEQ34 | ATGTTAAATGGTCCCCACATTGGCAACATTTGAGTGGGCAAGCA CTTGAACCTACTCATAAAAAAATTTCAGTGTACATTATTCATA |
| 4B | Hermann 1998 | SEQ42 | ATGTTAAACTGTCCAACATTGGTCAACTGTGTATTTAGTCA ATTGAACACTCATAAAAAAATTTCAGTGTATTTAGTCA |
| 4C | Hermann 1998 | SEQ43 | ATGTTAAACAGTCCAACATTGGCAAGTGTACGGGTCAAGCA AATTGAACCTACTGTAAAAAAATTTCAGTGTACATTNTTCNTTA |
| 4E | X57147, La Mantia et al. 1991 | ERV9 | TTTGGGATAGCCCTCATCTGTTGGTCAGGCCCTAGCCAAA GATCTAGGCCACTCTCAAGTCCAGGCCACTCTGGTGTCACT |
| 4F | Hermann 1998 | SEQ49 | TTCAAGGATATGCCCATCTATTGGTCAAGGCCATTGGCAGA CTTGAGCCAGTTCTCATACCTGGACACTCTGGTCCCTTGGTATA |
| 4G | Hermann 1998 | SEQ59 | TTTGGGATAGCCCTCATCTGTTGGTCAGGCCACAGGCCAG ATCTAGTCTCACTCTCAAGTCCAGGCCACTCTGGTGTCACT |
| 4H | Hermann 1998 | SEQ60 | TTTGGGACGCCACTCTCAAGTCCAGGCCACTCTGGTGTCACT ACCTCTCCAGCTACATCINNNCCYNGCATCTGGTCACT |
| 4I | Hermann 1998 | SEQ63 | TTCAAGGATAGCTCCCATCTATTGGCAGGCCATTAAACCCGAG ACTTAAGGCCAGTCTCATACGTGACACTCTGGCTTGGTA |

| | | | |
|----|--------------------------------------|-----------------|---|
| 4 | Hermann 1998 | SEQ64 | TTTAGAGATAGCCCTACCTGTTGCCAAGOATTGCCAAGA TTAAGTCACCTCTTGACCCAGTACCTTAATTCCTAAAT |
| 4L | AF009668 Blond et al. 1999 | HERV-W | TTCAGGGATAGCCCCATCTTGGCAGGATTAGCCCAAG ACTTGAGTCATTCTCATACCTGGACACTCTTGCCTTCAGTAC |
| 5A | AF020092 Seifarth et al. 1995 | HERV-K (47D) | CATGCTTAATAGTCACCTGAGGATCACTTTCAGTATTGTTG GCTTCACACTGTCAGGGATCACTTTCAGTATTGTTACATGGTGT |
| 5B | Hermann 1998 | SEQ05 | ATGCTTAATAGTCACCTGAGGATCACTTTCAGTATTGTTACATGGTCA CTTCACCTGTCAGGGATCACTTTCAGTATTGTTACATGGTGT |
| 5C | Hermann 1998 | SEQ10 | ATGCTTAATAGTCACCTGAGGATCACTTTCAGTATTGTTACATGGTGT TTCAACCTGTCAGGGATTCAGTTTCCCCGATGTTACATGGTGT |
| 5E | U46939 Griffiths et al. 1997 | SEQ | ATGACTAACAGTCCTGCCATATGCCAGGTATATGTTGACCGGGCA GTAGAGCCGTTGGCAGCAGTGCCTAAAGTACAAATTTCACAC |
| 5F | U39937 Li et al. 1995 | U46939 | ATGCTTAATAGTCACCTGAGGATCACTTTCAGTATTGTTACATGGTGT CTTCACACAGTTAGAGAAAAGTTTCAAGCTGTATATTATTCAT |
| 5G | Hermann 1998 | SEQ35 | AAACAGTATCAGGAGTTTACAGCAGTAGTCAAGGAAACTT AGTCATCTGGTGCAGTGGAAAGGCAATTGGATTAAAGGAGTCT |
| 5H | Hermann 1998 | SEQ36 | AAACAATGTTAGAATGGCTCACAGACTCAGGAAATACTTTACTT GTATTAAATGGTTGTACATAAGATAACAACTCAAGGAACCAAGCT |
| 5I | Hermann 1998 | SEQ41 | TACCATGGACCAAGCTCTGTTACGCGAGTCAAGGAACTGGAGG CAAGGATTCAGTGTGATCGTTGAGGGGGTGTAC |
| 5J | Hermann 1998 | SEQ77 | TGAAAGGGAGGACTTGGCACATTCTTAATGT GGCTCTGTAAATTTTAACACATGGACATGCTA |
| 6A | U35161 Medstrand et al. 1993 | HML-5 | ATGCTGAACAGTCCTACAGTGTCACTGTTAACATGTAATTCAGCT TTGCTCCCACTGAGTAAATAATTCTCAATTGCAAGATTATTATCAT |
| 6E | HRU46939 Griffiths et al. 1997 | HRV5 | ATGACTAACAGTCCTGCATATGCCAGCTATATGTTGACCGGGCA GTAGAGCCGTTGGCAGGCTGCCAAAGTACAAATTTCAC |
| 6F | Y07725 | Foamy virus | TTTTAAATAGTCAGGATGTTACAGCTGATGTTAGTAGTTA CTAAAAGAAATCCCTTAATGTTACAGTGTATGTTGATGATATTAT |
| 6G | Tuke et al. 1997 | HTLV1 | GTAAAGGAAATGCCCACCTGTTGAAATGCAGCTGCCCTAT CCTGCAAGCCCATTCGGCAAGCTTCCCCAATGCACTATTCTICA |
| 6H | M10060, Shimojohno et al. 1985 | HTLV2 | GTAAAGGAAATGCCCACCTGTTGAAATGCAGCTGCCCTAT CCTCAACCCCATGAGGAATGTTCCACATGCCACATTGTCGA |
| 6I | Tuke et al. 1997 | HIV1 | ATGGAAAAGGATCACCGCAATATTGCAAGTAGTGCACAAAAAT CTTAGAGCCCTTTTAAACAAATTCAGACATGTTATCTATICA |
| 6J | J04542 | HIV2 | TGGAAAAGGATCACCGCAATTTCTCAATTCTCATGATGAGGCAATC TTAGAACCTTTGAGAAAAGCAACCCAGACGTCATCTCATCRAA |
| 7A | U60269 Medstrand et al. 1997 | HML-6 | ATGGCTTAACAGTCTTACGCTATGTCAGCATTGTTAGGACAGGCA TTAAAGAAGGCCTGGAAATGTTCTGCTTACTGCTTACATCATC |

| | | | |
|-------|--------------------------------|------------------|--|
| 7B | Herrmann 1988 | SEQ38 | ATGGCTCAACACCTAGTTAAGTCAGCATTTGTTAGGAAGAGCATT AAAGGACTCTCAGAAATATGTTCCCACTGCCATCGTCATCGTCATTA |
| 7C | Herrmann 1998 | SEQ56 | ATGGCTTAACAGCATTATATCAGATGTTAGGATAGGCTTAA GCTGCCCTCTGAATATGTTCCACAGCCTACATCGTCATTTAT |
| 7E | M15122 | MMTV | ATGAAAAATAAGCCCTACTTTATGTCAAATTTGGACAAAGCT ATATTCGACTGTAAAGGATAAAATACCAAGACTCATATATTGTCAT |
| 7F | AF038600 | PERV | TTCAAGGAACCTCCGACCATCTTGACGAAGCCTACACAGAC CTGGCCPAACTTCAGGATCCAAACACCTCAGGTGACCCCTCCAG |
| | Akiyoshi et al. 1998 | BaEV | TTCAAAAPACTCTCCACTCTCTTGATGAGGCTCTCCACAGGAC CTCACCCGACTTCGGACCCAGATCCAGAAAGTGACCCCTCCAG |
| 7G | D10032 | | |
| | Kao et al. 1987 | GalV | TTCAAGGAACACTCTCCACTCTTGACGAAGCCTCCACCGAGAT TTGGCCPCCCTTTAGGGCCCTCAACCCCCAGGTGGTTACTCCAA |
| 7H | M26927 | | TTCAAAACAGTCCCACCCCTGTTGATGAGGACTGCACAGAC CTAGCAGACTTCGGATCCAGCACCCAGACTGTACCCCTGTCACAG |
| | Delessus et al. 1989 | MoMuLV | TTCAAGGAACACTCTCCACTCTTGACGAAGCCTCCACCGAGAT TTGGCCPCCCTTTAGGGCCCTCAACCCCCAGGTGGTTACTCCAA |
| 7I | J02255 Van Beveren et al. 1981 | | |
| 7J | M12349 | MPMV | ATGGCCGACAGTCCTACCTTATGTCAAAAATATGGGCCACGCC ATACATPAGETTAGACATGCCTGGAAACAAATGTATATTATACAT |
| | Soniigo et al. 1986 | | ATGTTAAATAAGTCCTCACAGTTGTCAAACTTTGTAGGCCAAACT ATCCAGCCCTGTTAGAGATCAGTTCCAGATTGTGCAGAAAAAG |
| 8A | U07856, Dangel et al. 1994 | HERV-KC4 | |
| 8B | Herrmann 1998 | SEQ31 | ATGTTAAACAGTCACAGTTGTCAAACTTTGTAGGCCAAAGCT ATCCAGCTAGTTAGAGATCAATTCCAGATTGTACATCATTCAT |
| 8E-8H | human genomic DNA | internal control | 100 ng 10 ng 1 ng 0.1 ng |
| 8I-8L | mixed oligo primers | internal control | 100 pmol 10 pmol 1 pmol 0.1 pmol |

Tabelle 3

A. Humane endogene retrovirale Sequenzen

| | | |
|--|-----------------------|---|
| Typ B Retroviren (HERV-K-Überfamilie) | HML-1 Untergruppe | HML1 (1A) Seq29 (1B*) |
| | HML-2 Untergruppe | HERV-K10 (2A) U87592 (2B) |
| | HML-3 Untergruppe | HML-3 (3A) S66676 (3B*) RT244 (3C*) Seq26 (3D*) Seq34 (4A*) Seq42 (4B*) Seq43 (4C*) |
| | HML-4 Untergruppe | HERV-K-T47D (5A) Seq05 (5B) Seq10 (5C) |
| | HML-5 Untergruppe | HML-5 (6A) |
| | HML-6 Untergruppe | HML-6 (7A) Seq38 (7B) Seq56 (7C) |
| | KC4 Untergruppe | HERV-K-C4 (8A) Seq31 (8B) |
| | unbestimmt | U39937 (5F) |
| Typ C Retroviren | HERV-H & verwandte | AF026252 (2J) Seq61 (2K) Seq66 (2L) |
| | ERV9 & verwandte | ERV9 (4E) Seq49 (4F) Seq59 (4G) Seq60 (4H) Seq63 (4I) Seq64 (4J) |
| | ERV-FRD | ERV-FRD (3E) Seq46 (3F) |
| | HERV-ERI Familie | HERV-E(4-1) (2H) Seq32 (2I) |
| | HERV-I & verwandte | HERV-I (3H) HERV-IP-T47D (3I) Seq65 (3J) |
| | HERV-T | S71 pCRTK1 (2E) S71 pCRTK2 (2F) |
| | HERV-W | AF009668 (4L) |
| | Typ D Retroviren | MPMV verwandte Seq36 (5H) |

Tabelle 3 (Fortsetzung)

| | | |
|----------------------------------|--------------------|--|
| Foamy Virus verwandt | HERV-L & verwandte | G895836 (1E) Seq39 (1F) Seq40 (1G) Seq45 (1H) Seq48 (1I) Seq51 (1J) Seq58 (1K) |
| unbestimmte retrovirale Elemente | | U46939 (5E) Seq35 (5G) Seq41 (5I) Seq77 (5J) |
| humane nonvirale Retroposons | | LINE-1 (3L) |

B. Exogene Retroviren

| | |
|----------------------------|---|
| Humane exogene Retroviren | HRV5 (6E) Foamy virus (6F) HTLV-1 (6G) HTLV-2 (6H) HIV-1 (6I) HIV-2 (6J) |
| endogene Säuger-Retroviren | MMTV (7E) PERV (7F) BaEV (7G) GaLV (7H) MoMuLV (7I) MPMV (7J) |

Abb. 1

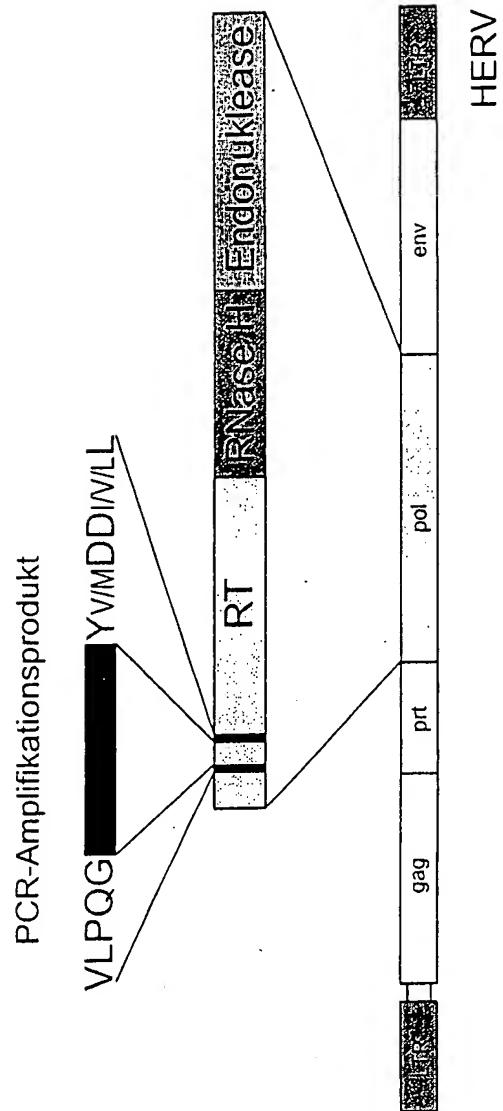


Abb. 2

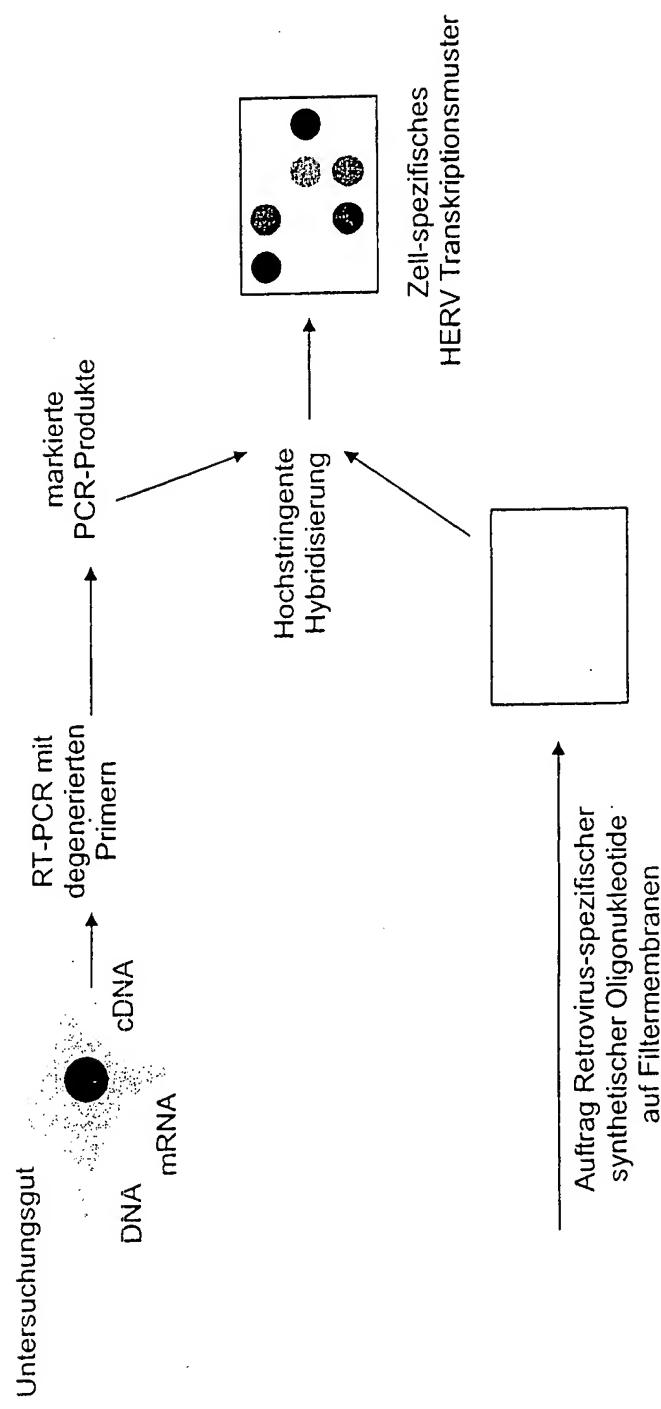
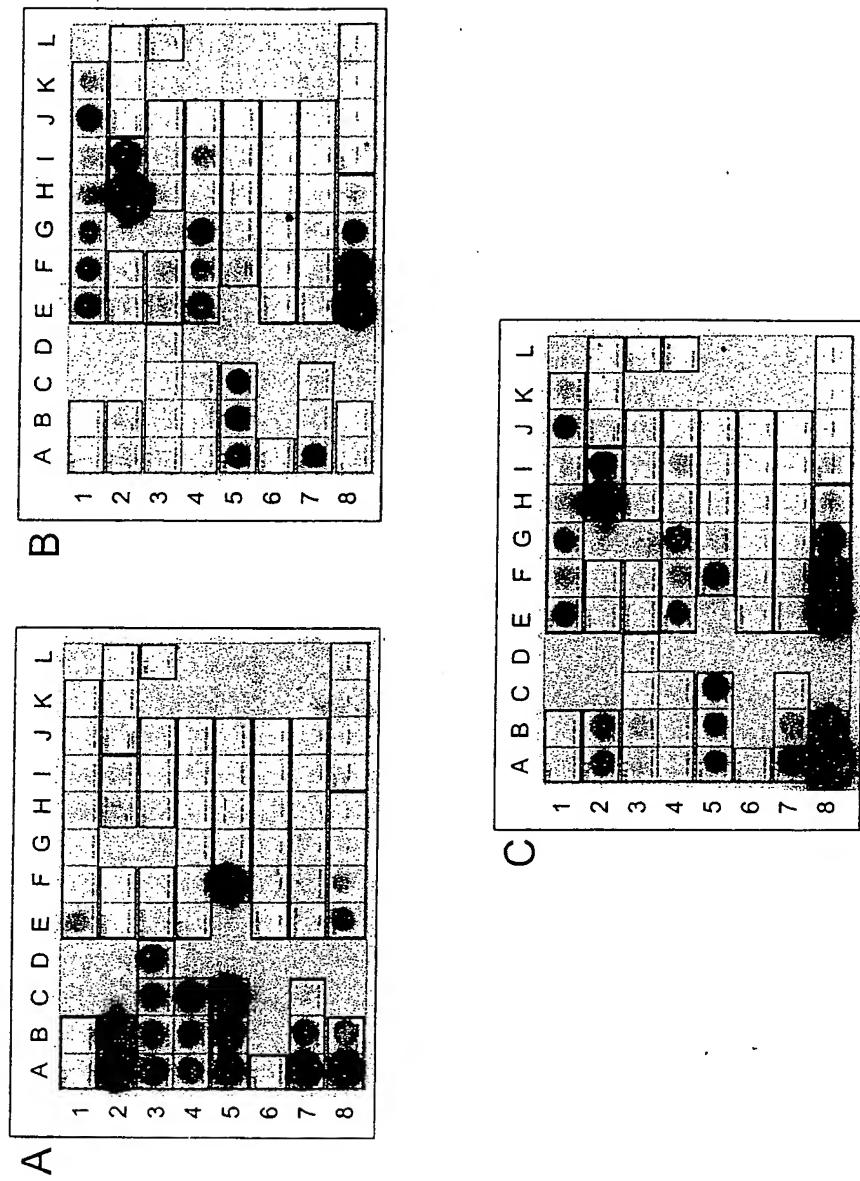


FIG. 3



41

FIG. 4